

**UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN ERFASSUNG
DER UNTERSCHIEDLICHEN REAKTION MENSCHLICHER
SERUM-CHOLINESTERASEN MIT E - 600
(0,0 - Diäthyl-0 (p-nitrophenyl) - phosphat)**

von

Francis Obiri

aus

Kumasi/Ghana (West Africa)

1973 # 342

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
em. Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN ERFASSUNG
DER UNTERSCHIEDLICHEN REAKTION MENSCHLICHER
SERUM-CHOLINESTERASEN MIT E - 600
(0,0 - Diäthyl - 0 (p - nitrophenyl) - phosphat)**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Francis Obiri

aus

Kumasi/Ghana (West Africa)



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Frau Prof. Dr. Dr. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Koreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 7. 1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung,	3
B Problemstellung	6
C Experimentelle Untersuchungen	9
D Versuchsergebnisse	12
E Diskussion und Zusammenfassung	17
F Literaturverzeichnis	19

A. Einleitung

Zur Charakterisierung der Toxizität von Alkylphosphaten wird oft die molare Konzentration an Wirkstoff angegeben, die in der Lage ist, die Aktivität von Cholinesterasen auf die Hälfte zu erniedrigen (I_{50}). Dieser Wert ist von der Art der Cholinesterase sowie auch den Versuchsbedingungen abhängig. Für E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) und Serumcholinesterasen sind in der Literatur Werte entsprechend Tabelle 1 genannt.

Tabelle 1

I_{50} -Werte für Serum-Cholinesterasen verschiedener Herkunft (aus der Literatur)

Herkunft des Serums	I_{50}	Autor
?	$1,4 \times 10^{-7}$	Schrader (1963)
Pferd	$1,4 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Ratte	$2,63 \times 10^{-8}$	Heath (1961)
?	$1,26 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Mensch	$0,87 \times 10^{-8}$	Rosival u. Mitarb. (1959)

Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) sowie Geldmacher-v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) haben nach Inkubation menschlicher Serum-Cholinesterase mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff fest-

gestellt. Bei Messung der Cholinesteraseaktivität von 75 Seren nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration fanden sie unabhängig von der Ausgangsaktivität eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität:

Gruppe	Anzahl d. Personen	Restaktivität in % d. Normalaktivität
I	38	0 - 5,5 (niedrig)
II	22	13 - 21 (mittel)
III	15	29 - 51 (hoch)

Tabelle 1

Normalaktivität und Restaktivität nach Vergiftung von 75 menschlichen Serumproben mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar).

Die gemessenen Einzelwerte sind in Abb. 1 wiedergegeben.

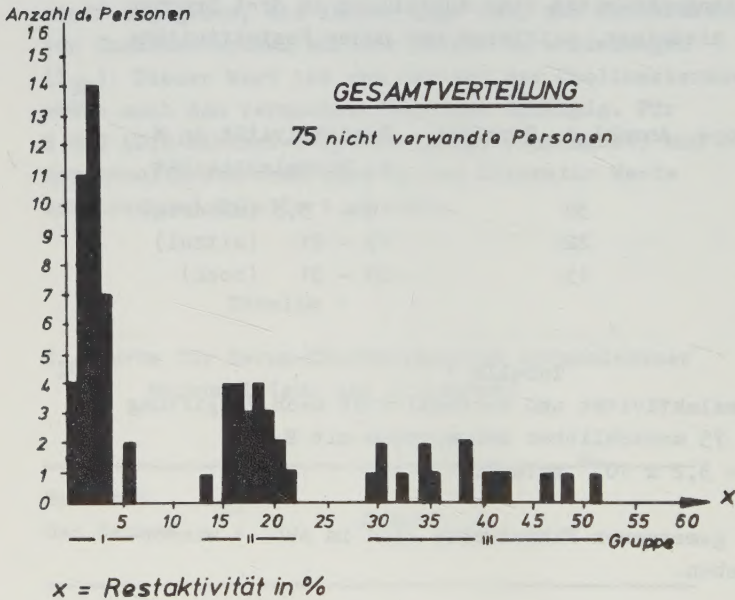


Abb. 1: Cholinesterase - Restaktivität von 75 menschlichen Seren nach Vergiftung mit E 600 ($c=3,2 \times 10^{-8} \text{ m}$) nach Geldmacher - v. Mallinckrodt und Lindorf (1969).

B. Problemstellung

Die gefundenen Unterschiede in der Restaktivität der Serum-Cholinesterasen nach Inkubation in vitro mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in bestimmte Konzentration, werfen eine Reihe von Fragen auf, besonders die Verteilung in Bevölkerung und eventuell genetisch. Voraussetzung ist eine sichere Abgrenzung der drei Gruppen; dazu ist eine sichere Bestimmung ohne Mitwirkung von Erythrozyten-Acetylcholinesterase nötig.

Bei einem fraglich hämolytischen Serum ist bei Verwendung von Acetylcholin die Spaltung des Substrats durch die Erythrozyten-Cholinesterase möglich. Hierdurch können Unterschiede in der Restaktivität der Serum-Cholinesterasen nach Inkubation mit E 600 (Paraoxon) bedingt sein. Um eine derartige Interpretation der von Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) an 75 Seren beobachteten Effektes auszuschließen, wurden parallele Versuche unter Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat gemacht.

Burgen und Mc Intosh sind der Meinung, daß das physiologische Substrat der Serum-Cholinesterase keinesfalls Acetylcholin sei. In Frage käme als Substrat Butyrylcholin, da Whittacker (1968) beobachtete, daß kein anderes Substrat so schnell wie Butyrylcholin durch die Serum-Cholinesterase abgebaut wird.

Es lag nahe zu prüfen, ob die unterschiedliche Reaktion der Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration substrat-spezifisch ist oder ob eine Spaltung von Butyrylcholin u.U. sogar zu einer besseren Differenzierung der Typen führen würde, worauf

schon Lindorf in einigen orientierenden Versuchen hingewiesen hatte (siehe Abb. 2).

In der vorliegenden Arbeit habe ich es unternommen, dieser Frage mit Hilfe von Seren mit bereits bekannter niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität, die als Substrat Acetylcholin benutzen, nachzugehen, wobei ich Butyrylcholin genommen habe.

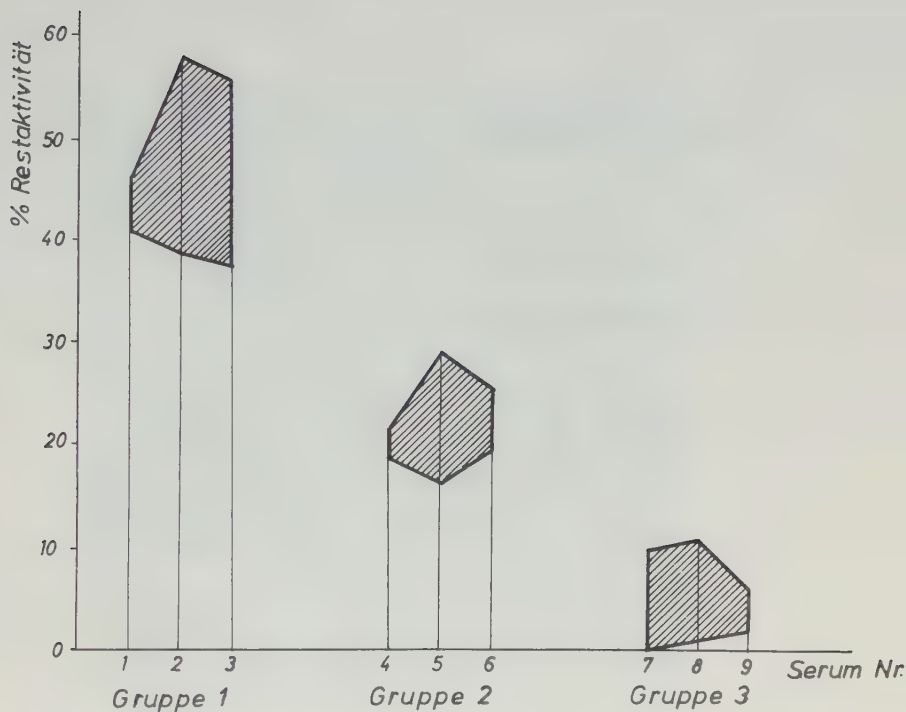


Abb. 2: Restaktivität der Serum-Cholinesterase nach Vergiftung mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration von jeweils 3 Seren mit hoher, mittlerer und niedriger Restaktivität bei Verwendung von

- a) Butyrylcholinjodid als Substrat (gestreifte und freie Fläche)
- b) Acetylcholinchlorid als Substrat (freie Fläche)

Gruppe 1 = hoher
 Gruppe 2 = mittlerer
 Gruppe 3 = niedriger

nach H.H. Lindorf

C. Eigene Untersuchungen

1. Methodik zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität mit Butyrylcholinjod als Substrat (in der Warburg-Apparatur).

a) Versuchsanordnung

Es wurden gesunden Erwachsenen 10 ml. Blut entnommen, das etwa 1/2 Stunde nach Entnahme 15 Min. bei 1500 g zentrifugiert wurde, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden durfte. Das erhaltene Serum wurde sofort abgetrennt und spätestens nach einer Stunde wurde die erste Messung durchgeführt.

Die Cholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der Modifikation von Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt.

Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgende Aktivitätsmessung abgestimmt.

b) Inkubation mit E 600

Für die Vergiftung des Fermentes wurden 1 μ l E 600 auf 90 ml. H₂O gegeben. Je 10 μ l dieser Lösung wurden sodann zu 13,5 ml, der als Verdünnungsflüssigkeit für das Serum verwendeten Salzlösung, gebracht. Diese Verdünnungsflüssigkeit war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9%igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26%igen NaHCO₃-Lösung. Vor Gebrauch wurde sie mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ durchströmt.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml. Serum mit 1,35 ml. der E 600-haltigen Verdünnungsflüssigkeit verdünnt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war $3,2 \times 10^{-8}$ molar.

Die Ansätze wurden sofort in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml. in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml. einer 0,5%igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjod bzw. Acetylcholinchlorid enthielt, an ein Manometer angeschlossen und in ein Wasserbad von 37°C gebracht wurde. Anschließend wurden alle Manometer mit dem $\text{CO}_2\text{-N}_2$ -Gemisch 20 Minuten durchströmt (siehe Abb. 3). Sodann wurde nach Schließen der Manometerhähne noch so lange bei 37°C inkubiert, daß eine Gesamt-Inkubationsdauer von 60 Min. erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (Süllmann, 1964).

c) Messung der Cholinesteraseaktivität

Nach beendiger Inkubation wurde die Serumverdünnung in der Anhangsbirne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (Süllmann, 1964).

Es wurde bei geöffneten Hähnen 3 Minuten geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min.) und anschließend das System geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann 30 Min. bzw. 1 Std. lang alle 15 Min. abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmungen mit und ohne E 600 auf ihre Aktivität getestet. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirne des

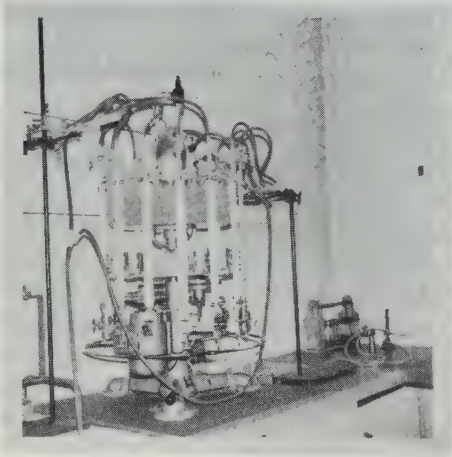


Abb. 3: Warburgapparat Typ V 85 der Firma Braun, Messungen, mit der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der Modifikation von Friedberg und Sakai (1958).

Kölbchens nur Verdünnungsflüssigkeit enthielt, wodurch die Eigenhydrolyse erfaßt wurde. Insgesamt konnten also in einem Versuchsablauf jeweils ein Serum niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität geprüft werden.

Es wurde streng darauf geachtet, daß der Anstieg der Manometersäulen linear erfolgte. War diese Forderung erfüllt, wurden die 30-Min.-Werte bzw. 60 Min. der Doppelmessung mit den jeweils entsprechenden Manometerkonstanten (Süllmann, 1964) multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetische Mittel beider Wertepaare gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen.

Die Angabe der Aktivität erfolgt in μ CO₂/Std. bezogen auf 0.05 ml. Serum.

2. Versuchsergebnisse

Es wurden 5 Seren von niedriger, mittlerer und von hoher Restaktivität im Serum untersucht. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 2

Niedrig = Gruppe I

Versuchs- personen	Substrate		Substrate	
	Acetyl- cholin	Butyryl- cholin	Acetyl- cholin	Butyryl- cholin
	Restaktivität in % der Norm nach Vergiftung		Mittelwert der Restaktivität in % nach Vergiftung	
	$\mu\text{l CO}_2/$ /60 min.	$\mu\text{l CO}_2/$ /30 min.	$\mu\text{l CO}_2/$ /60 min.	$\mu\text{l CO}_2/$ /30 min.
Neumüller	a) 2,9 b) 3,5	a) 3,6 b) 2,7	3,2	3,2
Opiz	a) 2,8 b) 2,6	a) 2,6 b) 3,2	2,7	2,9
Merklein	a) 1,7 b) 1,3	a) 1,5 b) 1,6	1,5	1,6
Geldmacher M.	a) 2,8 b) 2,8	a) 4,0 b) 2,5	2,8	3,8
Schaidt	a) 4,5 b) 5,2	a) 5,9 b) 2,6	4,9	4,3

Mittel = Gruppe II

Lautenbach	a) 23,3 b) 17,4	a) 21,6 b) 20,8	20,4	21,2
Meier U.	a) 23,2 b) 16,5	a) 22,5 b) 16,6	19,9	19,6
Sönning	a) 19,4 b) 20,0	a) 16,1 b) 17,9	19,8	17,0
Geldmacher J.	a) 13,2 b) 19,6	a) 15,3 b) 20,9	16,4	18,1
Geldmacher D.	a) 19,5 b) 17,4	a) 14,2 b) 17,9	18,5	16,1

Hoch = Gruppe III

Reinhardt	a) 29,2 b) 28,8	a) 30,7 b) 30,8	29,0	30,8
Obiri	a) 42,0 b) 41,2	a) 42,0 b) 54,2	41,6	48,1
Machbert	a) 44,6 b) 39,5	a) 44,7 b) 44,9	42,0	44,8
Flottwell	a) 39,4 b) 38,5	a) 39,5 b) 39,8	39,0	39,7
Geldmacher H.	a) 61,0 b) 60,6	a) 43,9 b) 54,0	60,8	48,6

Die einzelnen Typen ließen sich bei Verwendung von Butyrylcholin gut unterscheiden, wobei die Gruppe hoher E 600-spaltender Aktivität eine Restaktivität von 42,6%, die mittlere Gruppe durchschnittlich von 18,5% und die Gruppe I von 3,2% aufwies. Bei den parallel durchgeführten Versuchen mit Acetylcholin als Substrat lagen die Werte durchschnittlich bei 42,5% (Gruppe III = hoch), 19,0% (Gruppe II = mittel) und 3,0% (Gruppe I = niedrig). Mittelwert der Restaktivität = $a + b : 2$ (siehe Tabelle 2).

Die Meßwerte bei Verwendung von Acetylcholin und Butyrylcholin zeigen starke Korrelation. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,98, das heißt, daß an Stelle von Acetylcholin als Substrat ebensogut Butyrylcholin verwendet werden kann.

3. Besprechung der Ergebnisse

Die Verwendung von Butyrylcholin als Substrat zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität, insbesondere zur Differenzierung der E 600-Typen, ist möglich. Die Methodik bietet den Vorteil, daß bei gleicher Serum-Menge (bei uns 0,15 ml, bei Friedberg und Sakai 0,05 ml. pro Messung) die CO₂-Entwicklung mehr als das doppelte beträgt und so die Meßdauer auf die Hälfte der Zeit verkürzt werden kann.

Nachteilig bei Verwendung von Acetylcholin ist die Spaltung des Substrats auch durch die Erythrozyten-Cholinesterase bei einem hämolytischen Serum.

Da Butyrylcholin nicht von der Erythrozyten-Cholinesterase gespalten wird, kann durch die

Substratspezifität der Erythrozyten-Cholinesterase bei Verwendung von Butyrylcholin als Substrat selbst in einem hämolytischen Serum die unterschiedliche Aktivität des E 600-spaltenden Fermentes im Serum nachgewiesen werden.

D. Diskussion und Zusammenfassung

Die von Geldmacher-v. Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1969) gefundenen Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (Paraoxon) (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat), machen schon bei der relativ geringen Zahl (75 Seren) der untersuchten Seren eine Einteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesteraserestaktivität möglich.

Da bei einem fraglich hämolytischen Serum Unterschiede in der Restaktivität der Serum-Cholinesterasen nach Inkubation mit E 600 (Paraoxon) durch die Spaltung von Acetylcholin durch die Erythrozyten-Cholinesterase möglich sind, machte ich parallele Versuche unter Verwendung von Butyrylcholin als Substrat.

Die Restaktivität der Serum-Cholinesterase bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat nach Vergiftung mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration von jeweils 5 Seren mit hoher, mittlerer und niedriger E 600-spaltender Aktivität im Serum, ließ gut die drei unterschiedlichen Typen deutlich werden. Die Methodik bietet den Vorteil, daß bei gleicher Serummenge (0,15 ml.) die CO_2 -Entwicklung mehr als das doppelte beträgt und so die Meßdauer auf die Hälfte der Zeit verkürzt werden kann. Durch die Substratspezifität der Erythrozyten-Cholinesterase gegen Acetylcholin kann selbst in einem hämolytischen Serum bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat die unterschiedliche Aktivität des E 600-spaltenden Fermentes im Serum nachgewiesen werden.

Die von Geldmacher-v. Mallinckrodt, Lindorf und Rabast (1969) gefundenen Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterasen mit dem Alkylphosphat E 600, die schon bei der geringen

Anzahl der untersuchten Seren eine Einteilung in drei Gruppen möglich machten, lassen an eine genetische Steuerung denken.

Familienuntersuchungen zur Klärung dieser Frage und auch die Festlegung der Verteilung der drei Typen in der Bevölkerung sind mit Butyrylcholin sicher schnell möglich.

1. Friedberg, K. D. und F. Sakai:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

2. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., U. Rabast und H. H. Lindorf:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat)
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

3. Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., und H.H. Lindorf:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6. - 9.10.1969

4. Goedde, H. W., A. Doenicke und K. Altland:

Pseudocholinesterasen
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York (1967)

5. Krisch, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat (E 600) durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. II klin. Biochem. 6, 41 (1968)

6. Main, A. R.:

Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterases based on inhibition by organophosphates
J. biol. Chem. 244, 829 (1969)

7. Skrinjaric - Spoljar, M. und E. Reiner:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate
and ethyl-p-nitrophenyl ethylphosphate by
human seren
Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

8. Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Ge-
webestoffwechsels
In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-
-Chemischen Analyse, hrsg. von K. Lang und E. Lehn-
artz, Bd. VI A, Teil A. Berlin-Göttingen-Heidel-
berg-New York Springer 1964

9. Whittaker, M.:

The pseudocholinesterase variants. Differentiation
by means of alkyl alcohols
Acta genet. (Basel) 18, 325 (1968)

10. Whittaker, M.:

Differential inhibition of human serum-cholinesterase
with butyl alcohol: recognition of new phenotypes.
Acta genet. (Basel) 18, 335 (1968 a)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. Dr. E. Weinig für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut meinen Dank auszusprechen.

Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit so freundlich erteilten Rat.

Frau M. Peteny bin ich für die Hilfe bei der Auswertung verpflichtet, ebenso Herrn Dr. Lorke, Leiter des Institutes für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer AG für die Überlassung von reinem E 600.

Lebenslauf

=====

Ich wurde am 20.2.1940 als fünftes Kind des höheren Landwirtschaftsberaters Obiri und seiner Ehefrau Felicia in Kumasi / Ghana geboren.

Von 1945 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Boso / Ghana, ab 1955 das Gymnasium in Akropong / Akwapin / Ghana. Hier schloß ich im Jahre 1960 meine Gymnasialausbildung ab.

Von 1961 bis 1962 war ich bei der Luftwaffe von Ghana, anschließend bei der Luftfahrtgesellschaft Ghana Airways in Accra / Ghana.

Im September 1962 schrieb ich mich in England als Schüler und Student in Aston und an der Universität Edinburgh / Scotland ein, wo ich im September 1964 die "Pre-med" Prüfung bestand.

Von 1965 bis 1966 war ich als Student der klinischen Biochemie der "Queen's Medical School" Birmingham / England.

Im Mai 1966 besuchte ich die Sprachkurse des Goethe-Instituts Arolsen / Waldeck.

Im Mai 1967 schrieb ich mich in der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen - Nürnberg als ordentlicher Student ein, wo ich im März 1968 die Prüfung für das Vordiplom in Biologie bestand.

Im Sommer 1968 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der gleichen Universität.

Im Juni 1973 bestand ich in Erlangen die medizinische Staatsprüfung. Anschließend wurde mir im Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik die Möglichkeit zur Promotion gegeben.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990